

Aus dem Institut für Toxikologie und Pharmakologie
in Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. W. Koransky

STIMULIERUNG UND HEMMUNG VON
WACHSTUMSVORGÄNGEN IN DER RATTENLEBER
DURCH KÖRPERFREMDE SUBSTANZEN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der

Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

MARTIN ZIMEK

aus

Gelsenkirchen

Marburg 1977

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus dem Institut für Toxikologie und Pharmakologie
in Marburg

Direktor: Prof. Dr. med. W. Koransky

STIMULIERUNG UND HEMMUNG VON
WACHSTUMSVORGÄNGEN IN DER RATTENLEBER
DURCH KÖRPERFREMDE SUBSTANZEN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der

Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

MARTIN ZIMEK

aus

Gelsenkirchen

Marburg 1977

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg



Angenommen von dem Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am 27. Mai 1977

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan : Prof. Dr. med. F. Neurath

Referent : Prof. Dr. rer. nat. R. Schulte-Hermann

Correferent : Prof. Dr. med. W. Koransky

I N H A L T

Seite

Einleitung	1
Methoden	4
I. Versuchstiere und Substanzen	4
II. Vorbehandlung der Tiere	4
III. Präparation der Leber	5
IV. DNS - Konzentration	5
V. Spezifische Aktivität der DNS	6
VI. Präparation der Zellkerne	8
VII. Zahl, Grössenverteilung und Ploidiegrad der Leberzellen	8
Ergebnisse	10
A. : Lebervergrösserung nach BHT-Gaben	10
I. Relatives Lebergewicht	10
II. Leber-DNS und Einbau von ^3H -Thymidin	11
III. Zahl der DNS-synthetisierenden Zellen	13
IV. Zahl und Ploidiegrad der Leberzellkerne	13
B. : Beeinflussung des fremdstoffinduzierten und regenerativen Leberwachstums durch Aktivitätsveränderung der mischfunk- tionellen Oxydasen	15
I. Einfluss von CFT 1201	15
II. Einfluss von SKF 525 A, verschiedenen Barbitursäurederivaten, sowie von Aminopyrin	23

D i s k u s s i o n	26
I. Analyse der durch BHT induzierten Lebervergrößerung	26
II. Vergleich des durch BHT, α -HCH und Phenobarbital ausgelösten Leberwachstums	27
III. Wirkungsmechanismus des fremdstoffindu- zierten Leberwachstums	28
1. Hypothese: Beteiligung der mischfunktionellen Oxydase	28
2. Hypothese: Existenz von Fremdstoffrezeptoren	30
3. Hypothese: Beeinflussung der Membranpermeabilität	30
Z u s a m m e n f a s s u n g d e r E r g e b n i s s e	32
L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s	34

E i n l e i t u n g

Zahlreiche Substanzen von unterschiedlicher chemischer Zusammensetzung werden, wenn sie dem tierischen Organismus zugeführt werden, in der Leber umgewandelt. Zu ihnen gehört eine grosse Anzahl von Arzneimitteln, wie verschiedene Barbiturate, Aminopyrin, Orciprenalin u.a., weiterhin einige als Insektizide angewandte chlorierte Kohlenwasserstoffe wie das γ -Isomere des Hexachlorcyclohexans oder DDT, sowie auch Antioxydantien wie Butylhydroxytoluol.

Die meisten der genannten Fremstoffe werden von dem Enzymsystem der sogenannten mischfunktionellen Oxydase abgebaut, das im endoplasmatischen Retikulum der Leberzellen lokalisiert ist (Conney 1967). Die Untersuchung der Stoffwechselprozesse dieser Substanzen hat gezeigt, dass einige von ihnen nach mehrmaliger Verabreichung die Aktivität des sie abbauenden Enzymsystems steigern (Conney 1967) und gleichzeitig eine Vergrösserung der Leber bewirken (Goldberg 1966, Kunz et al. 1966, Schulte-Hermann 1974). Schlicht et al. konnten 1968 nachweisen, dass die durch das α -Isomere des HCH und durch Phenobarbital ausgelöste Lebervergrösserung auf Wachstum und nicht auf Oedembildung oder Speicherung von Fett, Glykogen u.ä. zurückzuführen ist. Dieses Organwachstum beruht auf Hyperplasie und Hypertrophie, auf einer Zunahme der Mitosen, der Gesamt-DNS und der DNS-Synthese, sowie auf einer Zunahme des Ploidiegrades (Schlicht et al. 1968, Schulte-Hermann et al. 1968).

Verzeichnis der Abkürzungen:

HCH	: 1,2,3,4,5,6, - Hexachlorcyclohexan
CFT 1201	: Phenyldiallylessigsäure - diaethylaminoäthylester
SKF 525 A	: Diphenylpropylessigsäure - β -diaethylaminoäthylester
BHT	: 3,5 - Di - Tert. - Butyl - 4 - hydroxytoluol
TAA	: Thioacetamid
RLG	: Relatives Lebergewicht
ZpM/ μ gDNS	: Zerfälle pro Minute und μ g DNS

1971 fand die gleiche Arbeitsgruppe, dass die durch α -HCH induzierte Lebervergrösserung reversibel ist, d.h. nach Absetzen der Substanz kehrt die Leber zu ihrer ursprünglichen Grösse zurück (Schulte-Hermann et al. 1971). In diesem Punkt unterscheidet sich das durch α -HCH ausgelöste Organwachstum wesentlich von dem Organwachstum, das durch cancerogene Stoffe ausgelöst wird. Dieses ist unter anderem durch ein ständiges Fortschreiten des Wachstumsprozesses bei gleichzeitigem Auftreten atypischer Zellformationen gekennzeichnet. Derartige für maligne Wachstumsprozesse charakteristische Veränderungen wurden, wie die histologischen Untersuchungen von I. Schlicht zeigten, beim Leberwachstum nach α -HCH-Gaben nicht beobachtet. Dieses beruht wohl auf einem anderen Mechanismus, als das durch Carcinogene hervorgerufene Organwachstum.

Auch vom Butylhydroxytoluol (= BHT), das wie α -HCH und Phenobarbital von der mischfunktionellen Oxydase der Lebermikrosomen abgebaut wird, ist bekannt, dass es zu einer Vergrösserung der Leber führt (Goldberg 1966). Diese Lebervergrösserung näher zu charakterisieren, sollte ein Ziel dieser Arbeit sein.

Hierzu haben wir die Gewichtsveränderungen von Rattenlebern und ihren DNS-Gehalt nach Gaben von BHT bestimmt. An den gleichen Lebern wurde der Einbau von ^3H -markiertem Thymidin in die Leber - DNS als Mass für die DNS - Neusynthese gemessen. Weiterhin wurde die Veränderung der Zahl der Zellkerne sowie die Veränderung ihres Ploidiegrades nach Gaben von BHT bestimmt. Schliesslich wurden in Zusammenarbeit mit Frau Prof. Schlicht, Berlin, autoradiographische und histologische Untersuchungen durchgeführt.

Der Mechanismus des nach α -HCH-Behandlung induzierten Leberwachstums ist unbekannt. Einblick in die initialen Vorgänge des Induktionsprozesses zu gewinnen, sollte ein zweites Ziel der vorliegenden Arbeit sein. Wir gingen dabei von der Erkenntnis aus, dass viele Substanzen, z.B. Tetrachlorkohlenstoff oder die meisten chemischen Carcinogene ihre biologischen Effekte erst

nach metabolischer Umformung entfalten. Entsprechend bedienen wir uns der Arbeitshypothese, dass α -HCH nicht direkt, sondern erst nach Umwandlung zu Metaboliten Leberwachstum auslöst. Die mischfunktionelle Oxydase ist am Stoffwechsel von α -HCH beteiligt (Kraus 1975). Um zu prüfen, ob dieses Enzym α -HCH in die letztlich wirksamen Metaboliten umwandelt, wurde seine Aktivität verändert und dann die Intensität des durch α -HCH ausgelösten Wachstumsprozesses gemessen. Zur Veränderung der Enzymaktivität benutzten wir Derivate der Phenyllessigsäure (CFT 1201 und SKF 525 A), verschiedene Derivate der Barbitursäure (Barbital, Phenobarbital und Hexobarbital) sowie Aminopyrin. CFT 1201 und SKF 525 A sind bekannt als Hemmstoff der mischfunktionellen Oxydase (Herken 1955, Axelrod et al. 1954, Cooper et al. 1954). Gleichzeitig wurde zum Vergleich der Einfluss von CFT 1201 und Phenobarbital auf nicht fremdstoffinduzierte Wachstumsvorgänge an der Rattenleber untersucht. Als Kriterien zur Beurteilung der Wachstumsvorgänge wurden im wesentlichen der DNS-Gehalt der Lebern und die Neusynthese von DNS bestimmt.

M e t h o d e n

I. Versuchstiere und Substanzen

Die beschriebenen Experimente wurden an weiblichen Ratten durchgeführt. Zu Beginn der Arbeit wurden "SPF (specific pathogen free) Wistar Ratten " des " Zentralinstituts für Versuchstierzucht" aus Hannover benutzt. Einige Versuche wurden an von diesen Tieren abstammenden, selbstgezogenen Ratten vorgenommen. In weiteren Versuchen wurden schliesslich konventionell aufgezogene "Sprague-Dawley"-Ratten der Firma Schwenke, Bad Nauheim bei Gross-Gerau benutzt. Wenn nicht anders angegeben, wurden fünf bis sieben Wochen alte, 120 bis 150 g schwere Tiere verwandt. Sie wurden in einem gleichmässig temperierten Raum bei ca. 21 - 23 Grad Celsius gehalten. Boden und Wände dieses Raumes wurden in regelmässigen Abständen mit Desinfektionsmitteln abgewaschen und anschliessend mit UV-Licht bestrahlt. Die Tiere erhielten Altromin R 15 und Leitungswasser ad libitum. In den einzelnen Versuchen wurden zwei bis fünf Tiere zu einer Gruppe zusammengefasst. Die Behandlung der Tiere erfolgte mit folgenden Substanzen:

α -HCH der Firma Schering, Berlin; CFT 1201 der Firma Chemische Fabrik Tempelhof, Berlin; SKF 525 A der Firma Smith, Kline u. French, Philadelphia, USA; BHT der Firma Shell. Barbital, Phenobarbital und Hexobarbital als Natriumsalze sowie TAA wurden bei Merck, Darmstadt bezogen; Isoproterenol bei Boehringer, Ingelheim; Aminopyrin bei Hoechst, Frankfurt; radioaktiv markiertes Thymidin bei New England Nuclear Corp., Boston. Das Thymidin war an der Methylgruppe tritiert und besass eine spezifische Aktivität von 5 C/mMol.

II. Vorbehandlung der Tiere

1. α -HCH und BHT wurden in Rapsöl gelöst (2% bzw. 10%) und oral mit Hilfe einer Schlundsonde verabreicht.
2. Barbital und Phenobarbital wurden in Aqua dest. gelöst und oral, Hexobarbital und Aminopyrin in gleichem Lösungsmittel i.p. appliziert.

3. CFT 1201, SKF 525 A, Isoproterenol und TAA wurden in wässriger Lösung i.p. verabreicht.

Die jeweils verabreichten Dosen und der Zeitpunkt ihrer Applikation werden bei der Beschreibung der Versuche angegeben.

4. Wenn nicht anders angegeben, wurde radioaktiv-markiertes Thymidin zwei Stunden vor Dekapitation der Tiere in einer Dosis von 1 mCi/kg in eine Schwanzvene injiziert ("Radioaktive Versuchszeit": 2 Std.). Um eine vollständige Applikation sicherzustellen, wurde ca. 0,5 ml physiologische Kochsalzlösung nachinjiziert.
5. Die partielle Hepatektomie wurde so durchgeführt, dass die beiden grossen Leberlappen (entspr. ca. 65% der Organmasse) in Äther-Narkose reseziert wurden (Higgins und Anderson 1931). Die Operationen wurden vormittags zwischen 9.00 und 12.00 Uhr vorgenommen.

III. Präparation der Leber

Die Tiere wurden jeweils morgens zwischen zehn und elf Uhr dekapiert, um Einflüsse tagesrhythmischer Schwankungen auf die zu untersuchenden Parameter auszuschliessen. Nach dem Ausbluten der Tiere wurde die Leber vollständig präpariert, durch Betupfen mit Filterpapier oberflächlich getrocknet und gewogen. Aus dem absoluten Lebergewicht wurde das relative Lebergewicht (= RLG) - das Lebergewicht in Prozent des Körpergewichts - berechnet. Nach Entnahme von Gewebstücken für die histologische Untersuchung wurden die Lebern der Tiere einer gleichbehandelten Gruppe auf 0 Grad Celsius gekühlt, mit der Schere zerschnitten und gemischt. In anderen Versuchen wurden die Einzellebern zu weiteren Experimenten verwandt.

IV. Bestimmung der DNS-Konzentration in der Leber

Portionen von ca. 1 g der Lebermasse wurden genau gewogen und mit Hilfe eines Ultraturax in 10 ml 2,0% Perchlorsäure

(enthaltend 2,5% Natriumpyrophosphat) in der Kälte homogenisiert. Von diesem Homogenat wurden 0,5 oder 1,0 ml zentrifugiert, und das so erhaltene Sediment zur Entfernung der Mono- und Oligonukleotide zweimal mit 2% Perchlorsäure und zur Entfernung der Lipide je einmal mit Alkohol/Aether (2 : 1) und Aether gewaschen. Der Rückstand wurde an der Luft getrocknet. Anschliessend wurde die DNS mit 5% Perchlorsäure in einem Wasserbad (30 Min., 75 Grad Celsius) extrahiert. Die DNS-Bestimmung erfolgte nach einer von B u r t o n 1956 angegebenen Methode. Sie stellt eine Verbesserung der 1930 von D i s c h e beschriebenen Methode dar, bei der Diphenylamin nahezu spezifisch mit der in der DNS enthaltenen Desoxyribose reagiert. Die Konzentration des entstehenden blauen Farbstoffs wurde spektralfotometrisch bei 595 m μ bestimmt. Als Eichstand diente Kalbsthymus - DNS der Firma Calbiochem. Aus den erhaltenen Messwerten wurde die DNS Menge pro Gramm Leber errechnet.

V. Bestimmung der spezifischen Aktivität der DNS

Zu dieser Bestimmung wurde die Leber wie oben homogenisiert. Infolge der kurzen radioaktiven Versuchszeit von zwei Stunden enthielt das Homogenat noch säurelösliche, nicht in DNS eingebaute Radioaktivität. Diese wurde durch zwei Waschungen mit 2% Perchlorsäure entfernt, wie wir durch Messung der Radioaktivität in den Überständen nachgewiesen haben (Tabelle 1). Die weitere Waschung des Niederschlags und die Extraktion der DNS erfolgt wie oben beschrieben.

Proben-Nr.	Überstand aus Homogenat	Überstand nach 1. Waschung	Überstand nach 2. Waschung
1	1305	132	12
2	1546	93	11
3	1002	79	8
4	1138	112	14
5	1665	101	8
6	1727	132	10

Tabelle 1: Aktivität des Überstandes in IpM/ml vor und nach Waschung mit 2% Perchlorsäure.

Zur Messung der Radioaktivität wurde der Tricarb-Flüssigkeits-szintillationszähler der Firma Packard benutzt. In den ersten Experimenten der vorliegenden Arbeit wurden 0,1 ml des DNS-haltigen Extraktes in 2,5 ml Aethanol gelöst und mit 11,5 ml Szintillator-Toluol (= 3 g PPO (= 2,5 Diphenyloxazol) + 100 mg PoPoP (= 4-Methyl-5-Phenyloxazylbenzol) + Toluol ad 2000) versetzt. Jede Probe wurde drei bis fünf Mal 10 Minuten lang gezählt; aus dem Mittelwert wurden die Impulse pro Minute (IpM) bestimmt. Aus diesem und dem "Löschfaktor", der mit Hilfe des externen Standards bestimmt wurde, wurden die Zerfälle pro Minute (ZpM) errechnet. Die Zählausbeute betrug ca. 20%.

Bei diesen Messungen stellten wir fest, dass bei aufeinanderfolgenden Zählungen der gleichen Probe eine zeitabhängige Abnahme der Impulse auftrat. Ein repräsentativer Versuch ist in Tabelle 2 dargestellt. Wurden die Zählgläser zwischen den einzelnen Zählungen aufgeschüttelt, blieb die Zahl der Impulse konstant. In einigen Versuchen haben wir den Proben 400 mg CAB - O - SIL zur Stabilisierung der Substanz zugesetzt. Dadurch wurde der Abfall der Impulse verhindert (Tabelle 2, Spalte 2).

Diese Beobachtungen deuteten darauf hin, dass die Abnahme der Impulse auf eine Sedimentation der DNS in dem hydrophoben Medium zurückzuführen sein könnte.

Zeit nach Beginn der Messung	Impulse/ml u. Min.	
	ohne Zusatz	mit CAB-O-SIL
50 Min.	562	450
6,5 Std.	560	461
12 Std.	524	459
18 Std.	533	467
24 Std.	506	460

Tabelle 2: Verhalten der IpM/ml in Abhängigkeit von der Zeit ohne und mit Stabilisator.

In späteren Versuchen haben wir anstelle des Alkohols Triton X - 100 (Firma Serva, Heidelberg) als Lösungsvermittler dem Szintillator-Toluol zugesetzt (7 Teile Szintillator-Toluol und 1 Teil Triton X - 100). In diesem Medium beobachteten wir keinen Abfall der Zählwerte

VI. Präparation der Zellkerne

Zur Präparation der Kerne wurde ein Verfahren angewandt, das im Prinzip auf die Arbeiten von F a l z o n e et al. 1959 und C h a u v a u et al. 1956 zurückgeht. Dabei werden die Leberzellen durch Homogenisierung des Lebergewebes in 1% Zitronensäure zerstört. Die Zellkerne bleiben dabei intakt und werden anschliessend durch fraktionierte Zentrifugation aus dem Homogenat isoliert und in 5% Zitronensäure aufgenommen. So entsteht eine Kernsuspension, die bei mikroskopischer Betrachtung frei von Fremdpartikeln und Kernaggregaten ist, die bei der späteren Zählung im Partikelzählgerät zu fehlerhaften Messungen führen würden (Einzelheiten des Verfahrens siehe Schulte-Hermann 1968).

VII. Bestimmung von Zahl, Grössenverteilung und Ploidiegrad der Leberzellen

Die Zählung und Volumenanalyse der Zellkerne erfolgt mit Hilfe eines elektronisch arbeitenden Partikelzählgerätes (Celloscope 202) in Anlehnung an eine von S a n t e n 1965

beschriebene Methode. Die Arbeitsweise des Geräts soll hier kurz beschrieben werden: An den Enden einer Kapillaren, durch die eine Elektrolytlösung fließt, ist eine bestimmte Spannung angelegt. Enthält diese Lösung Partikel, deren Leitfähigkeit von der der Elektrolytlösung abweicht, so lösen diese eine Widerstandsänderung aus, die als Impuls registriert wird. Die Zahl der Impulse ist gleich der Zahl der Partikel, die in der Messzeit durch die Kapillare gelaufen sind. Gleichzeitig lassen sich mit diesem Gerät die Partikelvolumina bestimmen, da die Impulshöhe proportional dem vom Partikel verdrängten Flüssigkeitsvolumen ist. Durch Zählung bei verschiedenen Schwellenwerten lässt sich somit in einem gegebenen Kollektiv die statistische Verteilung der Partikelvolumina bestimmen und in einer Volumenverteilungskurve niederlegen.

Bei unseren Zählungen wurde eine $50\ \mu$ Kapillare benutzt. Die Kerne waren in 5% Zitronensäure suspendiert (Konzentrationsbereich: $2,5 - 200 \times 10^3$ Kerne / ml). Alle Messungen wurden drei bis 10 Mal vorgenommen. Als Kontrolle diente ein Leerwert der Zählflüssigkeit, der jedoch stets so gering war, dass er bei der Berechnung vernachlässigt werden konnte.

Zur Bestimmung des Ploidiegrades wurden zunächst alle Kerne der Suspension gezählt. Durch Einstellen eines geeigneten Schwellenwertes wurde dann die Zahl der tetra- (und höher) ploidien Zellkerne bestimmt und ihr Anteil an der Gesamtkernzahl in Prozent errechnet. Diesen Wert bezeichneten wir als Ploidiegrad. In den Kernpräparationen wurde neben der Kernzahl auch der DNS-Gehalt bestimmt und daraus die Zahl der Kerne berechnet, die zusammen 1 mg DNS enthielten. Da der DNS-Gehalt der Leber gleichzeitig bestimmt wurde, liess sich die Gesamtzahl der Leberzellkerne berechnen.

E r g e b n i s s e

A : Lebervergrößerung nach BHT - Gaben

Andere Arbeitsgruppen haben berichtet, dass BHT eine Vergrößerung der Leber verursacht (Goldberg 1966; Johnson et al. 1961; Pascal et al. 1970). Wir haben geprüft ob diese Vergrößerung unter unseren Versuchsbedingungen reproduzierbar ist und ob sie ganz oder teilweise auf Hyperplasie beruht.

I. Relatives Lebergewicht

Tabelle 3 zeigt die Zunahme des relativen Lebergewichts (RLG) nach mehrmaliger Applikation von BHT. Nach zweimaliger Verabreichung ist bereits ein deutlicher Gewichtsanstieg zu erkennen. Nach elf-tägiger BHT-Behandlung beträgt der Zuwachs an Lebermasse ca. 50%.

Vorbe- handlung	RLG	Zuwachs in % der Kontrollen	mg DNS pro RLG	Zuwachs in % der Kontrollen
-	4,36	-	12,6	-
1x BHT	4,33	-	12,0	-
2x BHT	5,36	23	15,2	21
6x BHT	5,97	37	17,7	41
10x BHT	6,23	43	16,3	30
11x BHT	6,62	52	17,2	37

Tabelle 3: Relatives Lebergewicht (RLG) und DNS-Gehalt der Leber nach Gaben von BHT.

BHT-Dosierung: 500 mg/kg u. Tag ein bis elf Tage lang. Tierzahl pro Versuchsgruppe 2 - 7. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte der Gewichte bzw. des DNS-Gehalts der einzelnen Lebern.

Diese Zunahme des relativen Lebergewichts könnte jedoch durch Abnahme des Körpergewichts infolge der BHT-Behandlung bedingt sein. Eine solche Annahme liegt nahe, da von anderen Autoren

beschrieben wurde, dass die Behandlung mit hohen BHT-Dosen zur Verzögerung des Körperwachstums bei Ratten führt (Johnson 1961). Wir haben daher während der Versuche die Gewichtsveränderung behandelter und unbehandelter Tiere verfolgt. Das mittlere Körpergewicht von 28 Ratten betrug zu Versuchsbeginn 145 Gramm. Nach elf Tagen war das Körpergewicht der unbehandelten Tiere ($n = 14$) auf durchschnittlich 174 g, das der mit BHT behandelten Tiere ($n = 14$, BHT: 500 mg/kg u.Tag) auf 153 g angestiegen. Das Körpergewicht aller Tiere nahm also während der Versuchsdauer zu; das Gewicht der mit BHT behandelten Tiere war etwa 10% geringer, als das der unbehandelten Kontrolltiere. Die geringe Differenz im Zuwachs des Körpergewichts kann die Zunahme des RLG um 50% nicht erklären. Somit bestätigen die Ergebnisse die Untersuchungen anderer Autoren, dass BHT-Gaben bei Ratten zu einer Vergrößerung der Leber führen.

II. Leber-DNS und Einbau von ^3H -Thymidin

Die Ergebnisse der Bestimmungen des DNS-Gehalts der Lebern zeigen Tabelle 3 und Abbildung 1. Sie lassen erkennen, dass BHT in Abhängigkeit von der Applikationsdauer zu einer Erhöhung der Leber-DNS im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren führt. Der Zuwachs beträgt nach zweimaliger Verabreichung von 500 mg BHT pro Kilogramm Körpergewicht bereits etwa 20%. Bei weiteren BHT-Gaben erreicht die DNS-Zunahme ein Maximum von 30 bis 40%. Tabelle 3 zeigt ausserdem, dass sich der Verlauf der DNS-Zunahme ziemlich genau mit dem des relativen Lebergewichts deckt. Um festzustellen, ob der erhöhte DNS-Gehalt der Lebern durch eine Steigerung der DNS-Syntheserate verursacht wird, wurde den mit BHT vorbehandelten Ratten ^3H -markiertes Thymidin injiziert. Wir haben die DNS aus den Lebern der so vorbehandelten Tiere extrahiert und die spezifische Aktivität in $\text{ZpM}/\mu\text{g}$ DNS bestimmt. Aus Tabelle 4 und Abbildung 1 geht hervor, dass nach BHT-Gaben tatsächlich eine erhebliche Zunahme der spezifischen Aktivität eintritt.

Ein Maximum ist 48 Stunden nach BHT-Applikation erreicht.

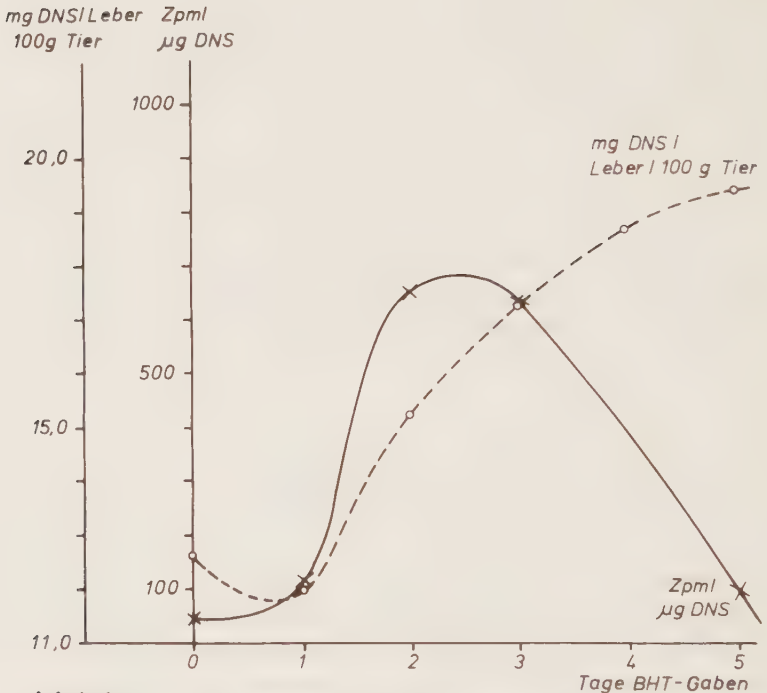


Abb.1: DNS-Vermehrung u. ^3H -Thymidin-Einbau in DNS nach Gaben von BHT. Versuchsbedingungen siehe Tabelle 3.

Danach ist trotz fortgesetzter Behandlung der Anstieg nach fünf Tagen weitgehend verschwunden. Diese Versuche zeigen, dass BHT-Gaben zu einer Steigerung des Einbaus von ^3H -Thymidin in die DNS der Lebern führen.

Vorbehandlung	ZpM/ μ g DNS	Zuwachs in % der Kontrollen
-	48	-
1xBHT	120	240
2xBHT	655	1265
3xBHT	638	1230
5xBHT	101	110

Tabelle 4 : DNS-Syntheserate nach Gaben von BHT

BHT-Dosierung wie Tabelle 3. Kontrollen: Mittelwert von 10 Versuchstieren; übrige Werte: je 4 Versuchstiere.

III. Zahl der DNS-synthetisierenden Zellen

Mit den gleichen Lebern wurden autoradiographische Untersuchungen zur Bestimmung der Zahl der DNS synthetisierenden Zellen durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass nach BHT-Gaben wesentlich mehr Leberzellen DNS synthetisieren als in Kontrollen (siehe Tabelle 6, Seite 19).

IV. Zahl und Ploidiegrad der Leberzellkerne

Es stellt sich die Frage, ob die Vermehrung der DNS durch eine erhöhte Kernzahl oder durch einen gesteigerten Gehalt an tetra- und oktaploiden Zellkernen, d.h. durch Erhöhung des Ploidiegrades bedingt ist. Um diese Frage zu klären, wurden die Zellkerne der Lebern der mit BHT behandelten Ratten isoliert, gezählt und der Ploidiegrad bestimmt. Abbildung 2 zeigt, dass nach elf-maliger Applikation von BHT die Kernzahl der Lebern um 40% gestiegen ist. Ausserdem ist auch der Ploidiegrad nach sechs- bis elfmaliger Applikation deutlich höher als bei Kontrollen.

Auf Grund der beschriebenen Ergebnisse kann man annehmen, dass die nach BHT-Applikation beobachtete Lebervergrösserung

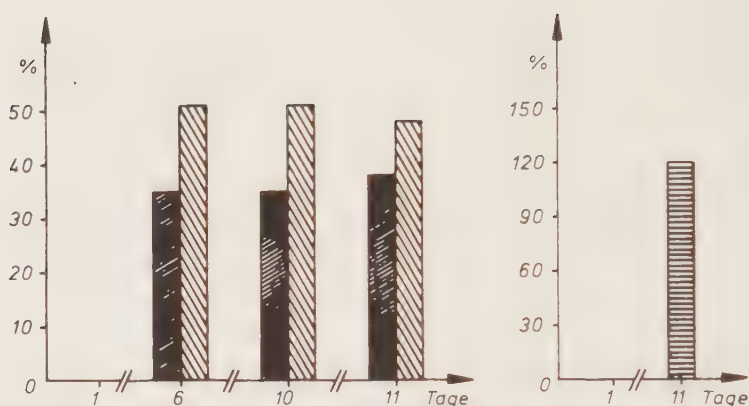


Abb. 2: Ploidiegrad u. Kernzahl nach Gaben von BHT

Linke Hälfte: Ploidiegrad in %, ■: Kontrollen;

▨: Ploidiegrad nach 6, 10 u. 11 mal BHT

Rechte Hälfte: Kernzahl / 100g Tier in % der Kontrollen nach 11 mal BHT.

BHT-Dosis wie Tabelle 3.

zumindest zum Teil auf Hyperplasie zurückzuführen ist und in ihrem Ausmass der Lebervergrösserung nach α -HCH Gaben vergleichbar ist.

B : Beeinflussung des fremdstoffinduzierten und regenerativen Leberwachstums durch Aktivitätsveränderung der mischfunktionellen Oxydasen.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollte der Wirkungsmechanismus des α -HCH als Stimulator des Leberwachstums näher untersucht werden. Hierzu haben wir in einer ersten Versuchsreihe die Aktivität der mikrosomalen mischfunktionellen Oxydasen durch Gaben des Hemmstoffs CFT 1201 verringert und anschliessend die Wirksamkeit von α -HCH und anderer wachstumsinduzierender Substanzen geprüft. Zusätzlich haben wir den Einfluss des CFT 1201 auf regeneratives Leberwachstum untersucht. In einer zweiten Versuchsreihe wurden SKF 525 A, verschiedene Barbitursäurederivate (Barbital, Phenobarbital und Hexobarbital) und Aminopyrin zur Hemmung der mikrosomalen Enzyme benutzt. Diese Substanzen sind ebenfalls Substrate der mischfunktionellen Oxydasen und sollten die Metabolisierung des α -HCH an diesem Enzym kompetitiv blockieren. Der Einfluss des Phenobarbitals wurde auch beim regenerativen Wachstum der Leber untersucht.

I. Einfluss von CFT 1201

Die Applikation von 200 mg/kg α -HCH führte bei unseren Versuchstieren zu einer Zunahme von Lebergewicht und Leber-DNS um jeweils etwa 30% (Abbildung 3, Gruppe I). Ebenso löst die alleinige Gabe von CFT 1201 eine Vergrösserung der Leber aus, wie sie bereits früher beobachtet wurde (Maibauer et al. 1958; Schlicht et al. 1968); auch der DNS-Gehalt des Organs wird durch CFT 1201 erhöht (Abbildung 3, Gruppe II). Wenn man jedoch die beiden wachstumsstimulierenden Substanzen kombiniert (Abbildung 3, Gruppe III), kommt es nicht zu einer Addition der Effekte: der Zuwachs an Lebermasse ist nur ebenso gross und der Zuwachs an DNS ist sogar geringer als bei alleiniger Gabe von α -HCH. Auffallend ist auch, dass der DNS-Gehalt nicht stärker zunimmt als bei den nur mit CFT 1201 behandelten Tieren.

In einem weiteren Experiment haben wir nun den Einfluss des

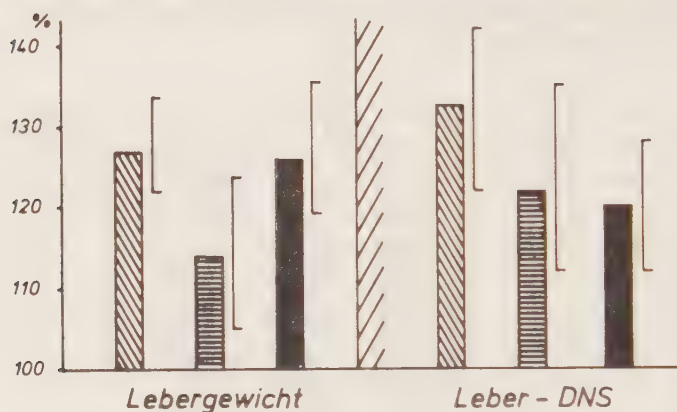


Abb. 3: Lebergewicht und Leber - DNS nach Gaben von α-HCH und CFT 1201

- ▨: α-HCH allein, 1x 200 mg/kg 4 Tage vor Dekapitation n=7
 ▤: CFT 1201 allein, 4 Tage vor Dekapitation tägl. 60 mg/kg morgens u. 90 mg/kg abends, n=5
 ■: α-HCH + CFT 1201, Dosierung wie bei ▨ u. ▤ n=7

n = Anzahl der Versuchstiere

Lebergewicht / 100 g Tier : 100 % = 4.8 g ± 0.2 g

Leber - DNS / 100 g Tier : 100 % = 10.6 g ± 0.6 g

Angabe der Steigerungsrate in % der Kontrolltiere n=8

Senkrechte Balken [: Standardabweichung

CFT 1201 auf die durch α-HCH ausgelöste Steigerung der Zellproliferation in der Rattenleber geprüft. Frühere Untersuchungen (Schlicht et al. 1968) hatten ergeben, dass ein bis 3 Tage nach Gaben von α-HCH der Einbau von ³H-Thymidin in DNS (gemessen als Zpm/μg DNS) stark erhöht ist. Diese Ergebnisse werden durch die hier beschriebenen Experimente bestätigt (Tabelle 5). Wenn die Versuchstiere jedoch zusätzlich zum α-HCH CFT 1201 erhalten, so ist die Zellproliferationsrate nicht höher als bei den unbehandelten Kontrolltieren, d.h. der stimulierende Effekt des α-HCH ist vollständig aufgehoben.

Tierz.	α -HCH	Hemmstoff	ZpM/ μ gDNS	markierte Leberzellen ^a	Mitosen ^a
6	-	-	53 $\pm$ 25	-	0,18 $\pm$ 0,39
11	+	-	241 $\pm$ 63	138,0 $\pm$ 35,0	9,4 $\pm$ 6,5
11	+	CFT 1201	47 $\pm$ 21	12,5 $\pm$ 5,7	1,7 $\pm$ 1,6
4	+	NaCl	179 $\pm$ 39	116,0 $\pm$ 17,0	12,8 $\pm$ 1,5

Tabelle 5: Zellproliferation und ³H-Thymidineinbau unter dem Einfluss von α -HCH, sowie CFT 1201 und NaCl.

α -HCH Dosis	: 150 u. 100 mg/kg Tier 48 u. 12 Stunden vor Dekapitation
CFT 1201 Dosis	: 120 mg/kg Tier 18 Stunden vor Dekapitation
NaCl Dosis	: 10 ml/kg Tier 18 Stunden vor Dekapitation
Thymidin Dosis	: 0,5 mC/kg Tier
a	: bezogen auf 1000 Leberzellen

Um sicherzustellen, dass der Verlust der α -HCH Wirkung nicht durch Injektion von Flüssigkeit herbeigeführt wird, haben wir anstelle des CFT 1201 physiologische Kochsalzlösung injiziert. Wie aus Tabelle 5 zu ersehen, verliert α -HCH in diesem Fall seine Wirkung nicht, so dass die Hemmwirkung dem CFT 1201 selbst zuzuschreiben ist. Das Ausmass der Hemmung ist von der Dosis abhängig. Abbildung 4 zeigt, dass die hemmende Wirkung des CFT 1201 auf den durch α -HCH ausgelösten Proliferationsreiz bei 120 mg/kg voll ausgebildet ist und bei einer Dosis von 15 mg/kg nicht mehr nachweisbar ist.

Wir haben nun untersucht, ob auch andere proliferationsanregende Stoffe in Gegenwart von CFT 1201 ihre Wirkung verlieren. Das Antioxydans BHT bewirkt wie α -HCH eine Vermehrung der Leber-DNS sowie eine Zunahme des Ploidiegrades (vorliegende Arbeit, Schulte-Hermann et al. 1971). Auch die Zellproliferation in der Leber ist nach zweitägiger Behandlung mit BHT

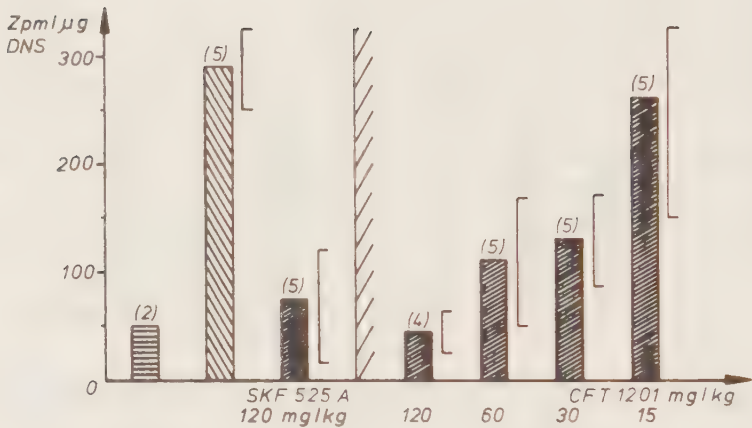


Abb. 4: Hemmung der α -HCH Induktion durch SKF 525 A u. CFT 1201 in Abhängigkeit von der Dosis gemessen am 3 H-Thymidin-Einbau.

▤: Kontrollen

▨: α -HCH

▩: α -HCH u. Hemmstoff [Standardabweichung

(): Zahl der Versuchstiere

erheblich gesteigert (siehe Seite 13 u. Seite 19). Eine zusätzliche Behandlung mit CFT 1201 verhindert diese Wirkung des BHT (Tabelle 6).

Mehrere Arbeitsgruppen (Kunz et al. 1966; Schlicht et al. 1968) haben eine Vergrößerung der Leber nach Phenobarbital-Gaben beschrieben. Tabelle 6 bestätigt die Befunde anderer Autoren (Schulte-Hermann 1968), nach denen der Einbau von 3 H-Thymidin in die DNS der Leber durch vier- und siebentägige Behandlung mit Phenobarbital gesteigert wird. Die zusätzliche Gabe von CFT 1201 hebt diese Steigerung des Thymidineinbaus wieder auf. CFT 1201 wirkt also auch dann wachstumshemmend, wenn der Wachstumsreiz durch bestimmte andere körperfremde Substanzen als α -HCH ausgelöst wird.

Exp.	Tier- zahl	BHT	Pheno- barbital	CFT 12ol	ZpM/ µg DNS	markierte Leberzellen ^a	Mitosen ^a
1	2	-	-	-	21	1,5	o
	2	+	-	-	324	115,0	1,5
	2	-	-	+	25	1,5	o
	2	+	-	+	76	20,0	0,25
2	3	-	-	-	81	-	-
	5	Oel ^b	-	-	92	-	-
	5	+	-	-	232	89,0 ± 41	9,3 ± 9,8
	5	+	-	+	22	6,0 ± 5,0	0,5 ± 0,5
3	2	-	-	-	23	-	-
	2	-	-	+	9	-	-
	3	-	+	-	57	-	-
	3	-	+	+	12	-	-
4	2	-	+	-	41	-	-
	3	-	+	+	8,6	-	-

Tabelle 6: Leberzellproliferation und ³H-Thymidineinbau nach BHT, sowie nach Kombination mit CFT 12ol (Exp.1+2).
³H-Thymidineinbau nach Phenobarbital, sowie nach Kombination mit CFT 12ol (Exp. 3 + 4).

BHT Dosis : 500 mg/kg Tier je 48 u. 24 Std.
 vor Dekapitation

CFT 12ol Dosis : 80 u. 40 mg/kg Tier 24 u. 18 Std.
 vor Dekapitation in Exp. 1; 120
 u. 40 mg/kg Tier 24 u. 18 Std. vor
 Dekapitation in Exp. 2; 60 u. 40
 mg/kg Tier 18 u. 12 Std. vor Dekapitation in Exp. 3 + 4

Phenobarbital
 Dosis : 100 mg/kg Tier tägl. während 4 Tagen (Exp. 3) u. 7 Tagen (Exp. 4)
 Dekapitation 24 Std. nach letzter
 Behandlung

Thymidin Dosis : 0,5 mC/kg Tier

a : bezogen auf 1000 Leberzellen

b : 5 ml/kg Oel anstelle der BHT-Lösung

Daß CFT 1201 nicht generell jeden durch Zufuhr von körperfremden Substanzen ausgelösten Wachstumsreiz hemmt, zeigen die Ergebnisse in Tabelle 7. Die Verabreichung von Isoproterenol in hoher Dosis führt zu einer Zellvermehrung in der Leber (Barka 1965, Barka u. Popper 1967). Unsere Versuchsergebnisse (Tab. 7) stimmen mit diesen Beobachtungen überein. Die zusätzliche Applikation von CFT 1201 führt hier - im Gegensatz zu den Experimenten mit α -HCH, BHT und Phenobarbital - nicht zu einer Verringerung des Thymidineinbaus.

Auch die Applikation von Thioacetamid (TAA) führt in der Rattenleber zu einer Steigerung der Zellproliferation. Diese dürfte dem Ersatz untergegangener Zellen dienen, da TAA in der angewandten hohen Dosierung eine Nekrose der im Läppchenzentrum gelegenen Parenchymzellen verursacht (Schlicht 1971).

Tabelle 7 zeigt, dass CFT 1201 auch die durch TAA verursachte Steigerung der Proliferationsrate nicht signifikant unterdrückt.

Exp.	Tier- zahl	mg/kg Isoprote- renol	TAA	mg/kg CFT 12ol	ZpM/ µgDNS	markierte Leberzellen ^d	Mitosen ^d
1	4	-	-	-	47± 17	-	-
	7	600	-	-	215±149	-	-
	5	600	-	80+40 ^a	236± 54	-	-
2	2	-	-	-	66±1,5	40± 1	1,75
	5	-	+	-	226±78	192±59	7,0±2,3
	5	-	+	120 ^b	163±31 ^c	190±58	5,1±4,7

Tabelle 7: Einbau von ³H-Thymidin nach Isoproterenol und CFT 12ol (Exp. 1). Leberzellproliferation und ³H-Thymidineinbau nach TAA und CFT 12ol (Exp. 2).

Isoproterenol : 600 mg/kg in 6 Einzeldosen (jeweils
Dosis : frisch zubereitete Lösung) über 30
Stunden verteilt appliziert. Tötung
der Tiere 44 Std. nach Beginn der Be-
handlung

TAA Dosis : 400 mg/kg 60 Std. vor Dekapitation

Thymidin Dosis: 0,5 mC/kg

a: 19 und 15 Std. vor Dekapitation

b: 19 Std. vor Dekapitation

c: p > 0,1

d: bezogen auf 1000 Leberzellen

Um zu prüfen, ob CFT 12ol die Zellvermehrung auch dann blok-
kiert, wenn sie nicht durch Fremdstoffe ausgelöst wird, haben
wir die Substanz partiell hepatektomierten Ratten verabreicht.
Bei diesen stellt das Bestreben des Organs zur raschen Regene-
ration des verlorengegangenen Gewebeanteils den Wachstumsreiz
dar. Die partiell hepatektomierten Ratten wurden 26 Stunden
post operationem getötet, da zu diesem Zeitpunkt die DNS-Syn-
these in der Leber annähernd maximal ist (Bucher 1963). Aus
Tabelle 8 lässt sich entnehmen, dass CFT 12ol die Zellvermehrung
unter diesen Bedingungen nicht beeinträchtigt, gleichgültig,

ob die Substanz gleichzeitig mit der Operation, einige Stunden später oder erst drei Stunden vor Dekapitation gegeben wurde.

Tier- zahl	mC/kg Thymidin	mg/kg CFT 1201	ZnM/ µg DNS	markierte Leberzellen ^a	Mitosen ^a
3		-	85	-	-
3		80 + 80 ^b	81	-	-
3	0,1	40 + 40 ^b	112	-	-
3		80 ^c	70	-	-
3		150 ^c	124	-	-
2		-	118	-	-
2	0,2	80 + 80 ^b	171	-	-
3		40 + 40 ^b	139	-	-
4		80 ^c	174	-	-
5		-	440 ± 144	297 ± 91	29,7 ± 5,4
5	0,5	120 ^d	421 ± 240	243 ± 144	23,9 ± 20,4

Tabelle 8: Einfluss von CFT 1201 auf die Zellproliferation partiell hepatektomierter Ratten

a: bezogen auf 1000 Leberzellen;

b: 1.Dosis gegeben zur Zeit der Operation,
2.Dosis 10 Std. post op.;

c: 3 Std. vor Dekapitation;

d: 19 Std. vor Dekapitation; ³H-Thymidin 24 Std.
post op.;

n < 0,4 im Vergleich zu unbehandelten hepatekto-
mierten Tieren.

Um zu prüfen, ob CFT 1201 die physiologische Zellproliferation in der Leber beeinträchtigt, wurde es Tieren verabreicht, auf deren Lebern kein exogener Wachstumsreiz ausgeübt wurde. Tabelle 9 zeigt, dass der Thymidineinbau bei den beiden unbehandelten Gruppen (Zeile 1 und 3) erheblich differierte.

Gruppe	Tierzahl	CFT 1201	ZpM / μ g DNS
1	6	-	22,2 $\pm$ 4,0
	10	+	22,7 $\pm$ 6,2
2	10	-	72,5 $\pm$ 26,8 ^a
	12	+	28,4 $\pm$ 14,0 ^b

Tabelle 9: Thymidin-Einbau bei unbehandelten Tieren und der Einfluss von CFT 1201.

CFT 1201 Dosis: 80 mg/kg Tier 22 Std. vor Dekapitation

a: $p < 0,02$ im Vergleich zu unbehandelten Tieren der Gruppe 1

b: $p < 0,05$ im Vergleich zu unbehandelten Tieren der Gruppe 2

Ähnliche Schwankungen traten von Versuchsreihe zu Versuchsreihe immer wieder auf; ihre Ursache ist unbekannt. Interessant ist, dass CFT 1201 in der Gruppe mit niedrigem Thymidineinbau ohne Wirkung war (Gruppe 1), dagegen in Gruppe 2 einen deutlichen Hemmeffekt aufwies. Offenbar hemmt die Substanz die hepatische DNS-Synthese dann, wenn sie durch endogene Reize erhöht ist. Zum Beispiel führen Schilddrüsenhormone zu einer Proliferationssteigerung in der Leber, die durch CFT 1201 blockiert werden kann (G.Schulte 1974).

II. Einfluss von SKF 525 A, verschiedenen Barbitursäurederivaten, sowie von Aminopyrin

Um festzustellen, ob die beobachtete Hemmwirkung spezifisch für CFT 1201 ist, oder ob auch andere strukturell vom CFT 1201 mehr oder weniger differierende Substanzen den gleichen Effekt zeigen, haben wir SKF 525 A, verschiedene Barbitursäurederivate und Aminopyrin verwandt und ihre Wirkung auf das durch α -HCH und BHT sowie auf das nicht fremdstoffinduzierte Leberwachstum untersucht.

Abbildung 4 zeigt, dass auch SKF 525 A den Effekt des α -HCH aufhebt. Auch die Barbiturate Barbital, Phenobarbital und Hexobarbital sowie Aminopyrin senken den durch α -HCH gesteigerten Thymidineinbau ähnlich wie CFT 1201 (Tab. 10, Seite 25). Weiterhin ist zu erkennen, dass Phenobarbital auch den durch BHT gesteigerten Thymidineinbau weitgehend wieder aufhebt. Die Zellproliferation nach partieller Hepatektomie wird dagegen durch Phenobarbital nicht blockiert.

Die Versuche zeigen, dass offenbar Substanzen verschiedener chemischer Struktur den Effekt von α -HCH und BHT aufheben können.

Tabelle 10

Vorbehandlung

Exp.	Tierz.	α -HCH mg/kg	BHT mg/kg	Hepatektomie	Barbital mg/kg	Phenobarb. mg/kg	Hexobarb. mg/kg	Aminopyrin mg/kg	Zpm/kg DNS	markierte ^d Leberzellen	Mitosen ^d
1	5	—	—	—	—	—	—	—	25 $\pm$ 2	—	—
	5	150 $\times$ 100	—	—	—	—	—	—	137 $\pm$ 32	—	—
	5	150 $\times$ 100	—	—	120	—	—	—	89 $\pm$ 7 ^a	—	—
	5	150 $\times$ 100	—	—	—	100	—	—	39 $\pm$ 2 ^b	—	—
	3	150 $\times$ 100	—	—	—	—	500	—	67 $\pm$ 9	—	—
2	5	150 $\times$ 100	—	—	—	—	—	500	14 $\pm$ 3	—	—
	2	Öl	—	—	—	—	—	—	97	—	—
	5	—	2 $\times$ 500	—	—	—	—	—	207 $\pm$ 15	—	—
3	5	—	2 $\times$ 500	—	—	100	—	—	85 $\pm$ 39 ^c	—	—
	5	—	—	+	—	—	—	—	440 $\pm$ 144	297 $\pm$ 82	297 $\pm$ 48
	6	—	—	+	—	100	—	—	496 $\pm$ 144	317 $\pm$ 88	38.0 $\pm$ 14.3

Zellproliferation unter dem Einfluß verschiedener Barbitursäurederivate und Aminopyrin nach Gaben von α -HCH (1), BHT (2) und nach partieller Hepatektomie (3)

Exp. 1: α -HCH - Gaben 150 mg am Tag 1, 100 mg am Tag 2, Dekapitation am Tag 3 jeweils morgens: Phenobarbital und Barbital jeweils 18 Std. vor Dekapitation; Hexobarbital und Aminopyrin in 5 Einzeldosen beginnend 18 Std. und endend 10 Std. vor Dekapitation. Thymidin - Dosis 0,2 mCi/kg; a: $p < 0,01$; b: $p < 0,001$;

Exp. 2: BHT - Gaben und Öl in gleichem Volumen an Tag 1 u. Tag 2, Dekapitation an Tag 3 jeweils morgens; Phenobarbital 18 Std. vor Dekapitation; c: $p < 0,001$;

Exp. 3: Hepatektomie 24 Std., Phenobarbital 19 Std. vor Thymidingabe. Thymidin - Dosis 0,5 mCi/kg; d. bezogen auf 1000 Leberzellen.

D i s k u s s i o n

I. Analyse der durch BHT induzierten Lebervergrößerung

Die Verabreichung von BHT an Ratten führt zu einer signifikanten Vergrößerung der Leber. Es wurde nachgewiesen, dass die Lebervergrößerung nicht durch eine Abnahme des Körpergewichts vorgetäuscht wurde. Gleichzeitig führt die BHT-Applikation zu einer Vermehrung der Leber-DNS, die relativ hinter der Gewichtszunahme zurückbleibt, was jedoch den Verhältnissen beim physiologischen Leberwachstum adoleszenter Ratten entspricht. Die Vermehrung der DNS beruht offenbar auf einer gesteigerten Neusynthese. Dafür sprechen der erhöhte Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin in die Leber-DNS und die histologischen Untersuchungen. Mit Hilfe von sogenannten Autoradiographien konnte nachgewiesen werden, dass DNS-synthetisierende Kerne in den Lebern von mit BHT behandelten Ratten wesentlich häufiger sind als in den Kontrollen. Die Tabelle 6 zeigt einen deutlichen Anstieg der aktiven, d.h. DNS-synthetisierenden Kerne am zweiten Tag nach BHT-Verabreichung. Zu diesem Zeitpunkt ist die biochemisch gemessene Aktivität der DNS maximal. Bei gleichzeitiger Bewertung der biochemischen und histologischen Untersuchungsergebnisse kann demnach als erwiesen angesehen werden, dass BHT eine DNS-Neusynthese in den Rattenlebern auslöst.

Es ergibt sich nun die Frage nach dem Verbleib der neugebildeten DNS. Dafür bestehen drei Möglichkeiten:

1. Es entstehen vermehrt tetra- und oktoploide Zellkerne.
2. Es entstehen vermehrt binucleäre Zellen.
3. Es erfolgt Zellvermehrung.

Die Analyse der Zellkerne im Partikelzählgerät ergab, dass BHT sowohl die Gesamtzahl der Zellkerne, als auch den Anteil der tetraploiden Kerne erhöht. Dabei konnte zunächst nicht differenziert werden, ob die Vermehrung der Gesamtzahl an Zellkernen von einer Vermehrung der Zellen begleitet wurde, oder ob

nur der Anteil der binucleären Zellen vermehrt wurde. Hier ermöglichen wiederum die histologischen Untersuchungen eine Entscheidung. Darin konnte nachgewiesen werden, dass BHT vermehrt Zellteilungen auslöst. Die Zahl der Mitosen stieg unter BHT deutlich an (Tab. 6; siehe auch Literatur in Schulte-Hermann 1974). Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass BHT zu einer Zunahme der Zellzahl in der Leber führt. Ausserdem erfolgt offenbar auch eine Zunahme des Ploidiegrads der Zellkerne.

II. Vergleich des durch BHT, α -HCH und Phenobarbital ausgelösten Leberwachstums

BHT, α -HCH und Phenobarbital führen zu einer Zunahme des Lebergewichts und zu einer Vermehrung der Leber-DNS. Auch die Kernzahl und der Ploidiegrad steigen nach Applikation der genannten Substanzen an (vorliegende Arbeit; Schlicht et al. 1964, Schulte-Hermann et al. 1964). Während die durch BHT und α -HCH beschriebenen Veränderungen an der Leber rasch eintreten, ist beim Phenobarbital eine vergleichsweise lange Applikationsdauer von 8 Tagen notwendig, um einen dem α -HCH oder BHT entsprechenden Zuwachs an Lebermasse zu erzielen (Schlicht et al. 1968). Die durch α -HCH oder BHT ausgelöste Neusynthese der DNS erfolgt rasch mit einem Maximum am zweiten Tag der Behandlung und einer Beendigung der Steigerung am etwa 4. bis 6. Tag. Dahingegen geht die DNS-Vermehrung durch Phenobarbital nur langsam vonstatten, läuft dafür aber über einen längeren Zeitraum von etwa 12 bis 14 Tagen ab (Schlicht et al. 1964). Der Vergleich zeigt, dass sich die drei Substanzen wesentlich durch den zeitlichen Ablauf ihrer Wirkung unterscheiden. Während der Wirkungsverlauf von α -HCH und BHT in etwa identisch ist, hebt sich der Wirkungsverlauf des Phenobarbitals deutlich von dem der erstgenannten Substanzen ab.

III. Wirkungsmechanismus des fremdstoffinduzierten Leberwachstums

1. Hypothese: Beteiligung der mischfunktionellen Oxydase

Das Ergebnis, dass α -HCH, BHT und - mit gewissen Unterschieden - auch Phenobarbital ein vergleichbares Leberwachstum auslösen, erscheint überraschend, da die drei Substanzen chemisch unterschiedlichen Stoffgruppen angehören. Ihnen ist aber gemeinsam, dass sie alle von den mischfunktionellen Oxydasen der Lebermikrosomen abgebaut werden. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen auch, dass das Wachstum unterdrückt werden kann, wenn die Fremdstoffe mit CFT 1201 kombiniert verabreicht werden. Es liegt daher nahe, die durch CFT 1201 ausgelöste Hemmung näher zu analysieren, um dadurch klarere Vorstellungen über die Wirkungsweise des fremdstoffinduzierten Leberwachstums zu gewinnen.

CFT 1201 und SKF 525 A sind bekannt als Hemmstoffe des Fremdstoffmetabolismus durch die mischfunktionellen Oxydasen der Lebermikrosomen (Cooper et al. 1954; Neubert und Herken 1955). Daneben beobachteten Neubert und Timmler unter dem Einfluss von CFT 1201 in vivo und in vitro aber auch einen verringerten Einbau von ^{14}C -Alanin in mikrosomale Proteine, sowie ausserdem Störungen mitochondrialer Funktionen (Neubert und Timmler 1960; Anders 1971). Es war daher denkbar, dass CFT 1201 und SKF 525 A bestimmte zur Zellteilung erforderliche Vorgänge hemmen könnten, ähnlich wie dies von Inhibitoren der RNS- und Proteinsynthese bei regenerativem Leberwachstum beschrieben wurde (Fujioka et al. 1963; Giudice et al. 1964). Unsere Befunde zeigen jedoch, dass CFT 1201 die Zellproliferation in der regenerierenden Leber nicht beeinträchtigt, gleichgültig, auf welche Phase der prae - DNS - synthetischen Vorgänge der Hemmstoff einwirkt. Auch die nach einer hohen Thioacetamid-Dosis eintretende Zellproliferation, die ebenfalls als regenerativer Prozess angesehen werden kann, wird durch CFT 1201 nicht signifikant blockiert.

Ferner konnten wir keinen Einfluss auf die physiologische DNS-Synthese feststellen, wenn diese nicht durch endogene Reize erhöht war. Damit erscheint ausgeschlossen, dass die beobachtete Hemmwirkung auf einer direkten Störung der DNS-Synthese oder auf Hemmung der RNS- bzw. Proteinsynthese beruht. Offenbar blockiert CFT 1201 in der Leberzelle nicht den Replikationsprozess selbst, sondern wird erst dann wirksam, wenn die Zellvermehrung durch bestimmte Fremdstoffe oder endogene Faktoren ausgelöst wird. Die Hemmung findet also vor dem Beginn der DNS-Synthesephase ("S"-Phase), d.h. also während der sogenannten "G₁"-Phase des Zellzyklus statt.

Unsere Ergebnisse lassen darauf schliessen, dass CFT 1201 auch die stimulierende Wirkung des Isoproterenols auf die Zellproliferation in der Leber nicht aufhebt. Diese Substanz wirkt ohne erkennbare Schädigung des Organs (Barka und Popper 1967). Die Zellvermehrung ist daher nicht wie beim TAA als regenerativer Prozess anzusprechen. Weiterhin ist anzunehmen, dass Isoproterenol durch andere Mechanismen wirkt als α -HCH, BHT und Phenobarbital, denn sonst wäre die unterschiedliche Wirksamkeit von CFT 1201 nicht zu deuten. Denkbar wäre, dass Verschiedenheiten im Stoffwechsel der Wachstum auslösenden Substanzen eine Rolle spielen. So sind Phenobarbital, α -HCH und BHT Substrate der mischfunktionellen Oxydasen (vgl. u.a. Gilbert und Goldberg 1967; Kraus 1975); dagegen ist eine Beteiligung dieses Enzyms am Stoffwechsel des Isoproterenols bisher nicht gesichert. Die vorliegenden Befunde sind daher vereinbar mit der Hypothese, dass die durch α -HCH, BHT und Phenobarbital ausgelöste Zellvermehrung in der Leber an eine ungehemmte Funktion der mischfunktionellen Oxydasen gebunden ist. Denkbar ist, dass die Fremdstoffe durch diese Enzyme in wirksame Metaboliten umgeformt werden, und dass CFT 1201 und SKF 525 A diese Umwandlung blockieren. In analoger Weise ist für verschiedene Substanzen postuliert worden, dass sie ihre biologische Wirkung erst nach einer

Metabolisierung entfalten. Dazu gehören CCl_4 (McLean u. McLean 1966, Slater u. Sawyer 1971, Stenger et al. 1970), aromatische Kohlenwasserstoffe (Brodie et al. 1971), Cancerogene (Magee 1965, Grover u. Sims 1970), Cyclophosphamid (Brock u. Hohorst 1967) und andere mehr.

Diese Hypothese findet weiterhin Unterstützung durch die Befunde, dass verschiedene Barbiturate die wachstumsstimulierende Wirkung des α -HCH und des BHT unterdrücken können. Ebenso wie CFT 1201 unterdrückt Phenobarbital nicht regenerative Wachstumsprozesse der Leber (Tabelle 10), so dass angenommen werden kann, dass auch diese Substanz nicht in die Replikationsprozesse der Leberzellen selbst eingreift. Barbital, Phenobarbital und Hexobarbital sind zwar nicht als Hemmstoffe der mischfunktionellen Oxydasen bekannt, wie etwa CFT 1201 oder SKF 525 A, sie sind aber Substrate dieses Enzyms. Als solche können sie die vermutete Entstehung der wirksamen Metaboliten von α -HCH und BHT durch Konkurrenz verhindern.

2. Hypothese: Existenz von Fremdstoff-Rezeptoren

Ob die Wirkung von α -HCH, BHT oder Phenobarbital tatsächlich eine Umformung in wirksame Metaboliten voraussetzt, lässt sich durch die beschriebenen Untersuchungen nicht entscheiden. So wäre auch denkbar, dass die Wachstumsinduktoren direkt eine Reaktion mit einem gemeinsamen, noch nicht näher bekannten Rezeptor eingehen und dadurch die beschriebenen Wachstumsvorgänge an der Rattenleber auslösen. So liesse sich die Hemmwirkung von CFT 1201, des Phenobarbitals und der anderen Substanzen, die zum Teil selbst Stimulatoren des Leberwachstums sind (Maibauer et al. 1958, Schulte-Hermann et al. 1968, vorliegende Arbeit Abb. 3), durch Konkurrenz mit α -HCH oder BHT um den hypothetischen Rezeptor erklären.

3. Hypothese: Beeinflussung der Membranpermeabilität

Die Hemmwirkung des CFT 1201 und der anderen Substanzen könnte auch darauf beruhen, dass sie die Permeabilität von Membranen

für die wachstumsinduzierenden oder für andere Verbindungen, welche für ihre Wirkung essentiell sind, verändern. Eine solche Annahme erscheint nicht abwegig, da das ähnlich wirksame SKF 525 A die Aufnahme bestimmter Pharmaka in isolierte Hepatocyten und in die Tubuluszellen der Niere hemmt (Henderson und Dewaide 1969, Hakim und Fujimoto 1971) und die osmotische Resistenz von Erythrocyten verändert (Lee et al. 1968).

Um zu prüfen, ob eine der genannten Hypothesen zutrifft, sind daher weitere Experimente erforderlich.

Z u s a m m e n f a s s u n g d e r E r g e b n i s s e

I. Tägliche Verabreichung von Butylhydroxytoluol (BHT) an Ratten führt zu einer Vergrößerung der Leber, die nach etwa 10 Tagen ein Maximum erreicht. Es wurde untersucht, ob diese Organvergrößerung auf Wachstum beruht und inwieweit Hyperplasie und Hypertrophie daran teilhaben. Parallel zum Gewichtsanstieg nehmen DNS-Gehalt, Zahl der Zellkerne und Ploidiegrad zu. Die Anzahl der Thymidin-markierten Zellen und der sich teilenden Zellen ist zwei Tage nach Beginn der Behandlung deutlich erhöht. Diese Befunde lassen den Schluss zu, dass BHT Leberwachstum bei Ratten induziert, das zum Teil auf Hyperplasie zurückzuführen ist.

II. Neben BHT induzieren zahlreiche weitere körperfremde Substanzen, z.B. α -Hexachlorcyclohexan (α -HCH), Phenobarbital und Isoproterenol ein Wachstum der Rattenleber. Einige dieser Substanzen sind zugleich Substrate der mischfunktionellen Oxydase der Lebermikrosomen. Es wurde untersucht, ob die Stimulation des Leberwachstums eine Metabolisierung dieser Substanzen durch die mischfunktionelle Oxydase voraussetzt. Hierzu wurden die wachstumsinduzierenden Fremdstoffe in Kombination mit Hemmstoffen (CFT 1201, SKF 525 A) sowie Substraten dieses Enzymsystems verabreicht und die Veränderung der DNS-Synthese gemessen. CFT 1201 und SKF 525 A unterdrücken in der Rattenleber die durch α -HCH ausgelöste Erhöhung des DNS-Gehalts und des ^3H -Thymidineinbaus sowie die Vermehrung der DNS-synthetisierenden Zellkerne und der Mitosen. Auch die durch BHT und Phenobarbital ausgelöste Steigerung der DNS-Synthese wird durch CFT 1201 unterdrückt. Der Hemmstoff ist dagegen wirkungslos, wenn die Zellproliferation durch Thioacetamid oder Isoproterenol ausgelöst wird. Die Zellvermehrung in der Leber partiell hepatektomierter Ratten wird durch CFT 1201 nicht beeinträchtigt. Die selbst Wachstum stimulierenden Barbiturate Barbital und Phenobarbital sowie Hexobarbital und Aminopyrin unterdrücken ebenfalls das durch α -HCH

ausgelöste Leberwachstum. Phenobarbital beeinträchtigt jedoch nicht die Zellvermehrung in der Leber partiell hepatektomierter Ratten. Diese Befunde sind mit der Annahme vereinbar, dass die Induktion des Leberwachstums durch α -HCH, BHT und Phenobarbital von Metaboliten dieser Verbindungen ausgelöst wird. Andere Hypothesen können jedoch ebenfalls zur Erklärung der vorliegenden Beobachtungen herangezogen werden. Zur Klärung des Wirkungsmechanismus der Fremdstoffe sind daher weitere Versuche notwendig.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

1. Anders, MW. : Enhancement and inhibition of drug metabolism. Ann.Rev.Pharmacol. 11, 37 (1971).
2. Axelrod, J., Reichenenthal, J., Brodie, B.B.: Mechanism of the potentiating action of β -diethylaminoethyl diphenylpropylacetate. J. Pharmacol.exp.Ther. 112, 49 (1954).
3. Barka, T. : Induced cell proliferation: the effect of isoproterenol. Exp.Cell Res. 37, 662 (1965).
4. Barka, T., Popper, H. : Liver enlargement and drug toxicity. Medicine (Baltimore) 46,103 (1967).
5. Brock, N., Hohorst, H.J. : Metabolism of cyclophosphamide. Cancer.Res. 20,900 (1967).
6. Brodie, B.B., Reid,W.D., Cho,A.K., Sipes, G., Krishna, G., Gillette, J.R. : Possible mechanism of liver necrosis caused by aromatic compounds. Proc. nat.Acad.Sci.(Wash). 68,160 (1971).
7. Bucher, N.L.R.: Regeneration of mammalian liver. Int.Rev. Cytol. 15,245 (1963).
8. Burton, K. :A study of the conditons and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of desoxyribonucleic acid.Biochem. J. 62,315 (1956).
9. Chauveau, J., Moulé, Y., Rouiller, Ch.: Isolation of pure and unaltered liver nuclei.Morphology an biochemical Composition. Exp.Cell Res. 11,317 (1956).
10. Conney, A.H.: Pharmacological implications of microsomal enzyme induction. Pharmacol.Rev. 19,317 (1967).
11. Cooper, J.R., Axelrod, J., Brodie, B.B.: Inhibitory effects of β -diethylaminoethyl diphenylpropylacetate on a variety of drug metabolic pathways in vitro. J.Pharmacol.exp.Ther. 112,55 (1954).

12. Falzone, J.A., Barrows, Ch., Shock, N.W.: Age and ploidy of rat liver nuclei as measured by volume and DNA content. *J.Geront.* 14,2-4 (1959).
13. Fujioka, M., Koga, M., Liebermann, J. : Metabolism of RNA after partial hepatectomy. *J.Biol.Chem.* 238,3401 (1963).
14. Gilbert, D., Goldberg, L. : BHT oxidase. A liver-microsomal enzyme induced by the treatment of rats with butylated hydroxytoluene. *Food Cosmet.Toxicol.* 5,481 (1967).
15. Giudice, G., Kenney, F.T., Novelli, G.D.: Effect of puromycin on deoxyribonucleic acid synthesis by regenerating rat liver. *Biochem. biophys.Acta (Amst.)* 87,171 (1964).
16. Goldberg, L.: Liver enlargement produced by drugs: its significance. *Proc.Soc.for the Study of Drug Toxicity*. Vol VII, p.171 (1966).
17. Grover, P.L., Sims, P.: Interactions of the K-region epoxides of phenantrene and dibenz-(a,h) anthracene with nucleic acids and histone. *Biochem.Pharmacol.* 19,2251 (1970).
18. Hakim, R., Fujimoto, J.M.: Inhibition of renal transport of morphine by β -diethylaminoethyl diphenylpropylacetate in the chicken. *Biochem.Pharmacol.* 20,2647 (1971).
19. Henderson, P.T., Dewaide, J.H.: Metabolism of drugs in isolated rat hepatocytes. *Biochem.Pharmacol.* 18, 2087 (1969).
20. Herken, H.: Wirkungssteigerung von Schlafmitteln durch den Phenylallylessigsäureester des Diäthylaminoäthanol. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmacol.* 225,453 (1955).

21. Johnson, A.R., Hewgill, F.R.: The effects of the anti-oxidants, butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene and propyl gallate on growth, liver and serum lipids and serum sodium levels of the rat. *Austral.J.exp.Biol.* 39,353-360 (1961).
22. Kerr, R., Lefevre, A., Lane, B., Lieber, C.S.: Liver growth induced by butylated hydroxytoluene (BHT). *Clin.Res.* 14,299 (1966).
23. Kraus, P. : Biodegradation of alpha-Hexachloro-cyclohexane, VI. The Dechlorination of α -Hexachloro-cyclohexane by Microsomes and Cytosol of Rat Liver. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.* 291,79-87 (1975).
24. Kunz, W., Schaude, G., Schmidt, W., Siess, M.: Lebervergrößerung durch Fremdstoffe. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 254,470 (1966).
25. Lee, J.P., Yamarura, H.J., Dixon, R.L.: The effect of β -diethylaminoethyl diphenylpropylacetate on biological membranes. *Biochem.Pharmacol.* 17,1671 (1968).
26. Magee, P.N.: Mechanism of drug-induced carcinogenesis. *Proc. 2nd Int.Pharm.Meet. Prague, Vol.4, p.343 New York: Pergamon 1965.*
27. Maibauer, D.: Neubert, D. Rottka, H.: Pharmakologische Untersuchungen bei der experimentellen Leberverfettung. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp. Path. Pharmacol.* 234,474/ (1958).
28. McLean, A.E.M., McLean, E.K.: The effect of diet and 1,1,1 - trichloro-2,2-bis- (p-chlorophenyl)ethane (DDT) on microsomal hydroxylating enzymes and on sensitivity of rats to carbon tetrachloride poisoning. *Biochem.J* 100,564 (1966).

29. Neubert, D., Herken, H.: Wirkungssteigerung von Schlafmitteln durch den Phenyl-diallylessigsäure-ester des Diaethylaminoethanols. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp.Path.Pharmak. 225,453 (1955).
30. Neubert, D., Timmler, R.: Einfluss einiger Phenylelessigsäurederivate (CFT 1201, SKF 525-A) auf den Einbau von l-C¹⁴-dl-Alanin in Mikrosomenproteine. Naunyn-Schmiedebergs, Arch.exp. Path.Pharmak.238,358 (1960).
31. Pascal, D., Durand, G., Penot, E.: Influence de l'ingestion de ditertio-butyl-hydroxytoluène (BHT) sur la croissance corporelle et sur la composition du tissu hépatique blanc.Arch.Sci. Physiol. 24,37 (1970).
32. Santen, R.J.: Automated estimation of diploid and tetraploid nuclei with an electronic particle counter. Exp. Cell Res. 40,413-420 (1965).
33. Schlicht, I.: Autoradiographische und radiochromatographische Untersuchungen der Verteilung und des Stoffwechsels von Thioacetamid. Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmak.268,310 (1971).
34. Schlicht, I., Koransky, W., Magour, S., Schulte-Hermann, R.: Grösse und DNS-Synthese der Leber unter dem Einfluss körperfremder Stoffe. Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmak. 261,26 (1968).
35. Schulte, G. :Die fremdstoff-induzierte DNS-Synthese der Leber und ihre Beeinflussung durch Schmerz und Entzündungsreize. Inaugural-Dissertation, Philipps-Universität Marburg 1974.
36. Schulte-Hermann, R., Thom, R., Schlicht, I., Koransky, W.: Zahl und Ploidiegrad der Zellkerne der Leber unter dem Einfluss körperfremder Stoffe. Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmak.261,42 (1968).

37. Schulte-Hermann, R., Koransky, W., Leberl, C., Noack, G.: Hyperplasia and hypertrophy of rat liver induced by α -hexachlorocyclohexane and butylhydroxytoluene. Retention of the hyperplasia during involution of the enlarged organ. Virchows Arch., Abt. B, Zellpath. 9, 125 (1971).
38. Schulte-Hermann, R.: Induction of liver growth by xenobiotic compounds and other stimuli. Crit. Rev. Toxicol. 3, 97-158 (1974).
39. Slater, T.F., Sawyer, B.C.: The stimulatory effects of carbon tetrachloride and other halogenoalkanes on peroxidative reactions in rat liver fractions in vitro. General features of the systems used. Biochem. J. 123, 805 (1971).
40. Stenger, R.J., Miller, R.A., Williamson, J.N.: Effects of phenobarbital pretreatment of the hepatotoxicity of carbon tetrachloride. Exp. molec. Path. 13, 242 (1970).

Herrn Professor Dr. Wolfgang Koransky danke ich herzlich dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, die dargestellten Untersuchungen in seinem Institut durchzuführen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Rolf Schulte-Hermann, dessen wertvolle Anregungen wesentlich zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben.

Frau Professor Dr. Irmgard Schlicht danke ich für die Erlaubnis, ihre Befunde in der vorliegenden Arbeit verwenden zu dürfen.

Fräulein Gisela Noack, Fräulein Christiane Leberl und Herrn Helmut Hanneberg bin ich für ihre Mitarbeit bei den beschriebenen Experimenten und für ihre wertvolle technische Unterstützung zu herzlichem Dank verpflichtet.

L e b e n s l a u f

Am 13. Januar 1944 wurde ich, Martin Zimek, als Sohn des Reviersteigers Friedrich Zimek und seiner Ehefrau Hildgard, geborene Kröning, in Gelsenkirchen geboren.

Nach vierjährigem Besuch der evangelischen Volksschule in Gelsenkirchen-Hessler wechselte ich 1954 zum Grillo-Gymnasium in Gelsenkirchen, an dessen neusprachlichem Zweig ich am 24.2.1964 die Reifeprüfung bestand. Zum Sommersemester 1964 immatrikulierte ich mich in die naturwissenschaftliche Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität in Bonn. Nach einem Semester wechselte ich zur Medizinischen Fakultät, an der ich am 4.8.1967 die ärztliche Vorprüfung bestand. Im Wintersemester 1968/69 setzte ich mein Studium an der Philipps-Universität in Marburg fort. Hier bestand ich am 15.12. 1970 die ärztliche Prüfung.

Gleichzeitig mit dem Wechsel nach Marburg begann ich mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit, die in dieser Form unter der Anleitung der Herren Professoren Koransky und Schulte-Hermann entstand.

Die Approbation als Arzt wurde mir am 7.8.1974 erteilt. Zur Zeit bin ich im Evangelischen Krankenhaus in Gelsenkirchen als Assistenzarzt in der Chirurgischen Abteilung tätig und strebe die Anerkennung als Facharzt für Chirurgie an.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:

in Bonn:

Dirschel, Domenzoz, Egli, v.Eiff, Goslar, Haferkamp
Korte, Passoth, Pichotka, Schmitz-Dumont, Schumacher,
Tonutti, Tschesche und Weitbrecht;

in Marburg:

Berendes, Buchholz, Dölle, Exner, Koransky, Linneweh,
Martini, Rodeck, Schleyer, Schmid, Schmitz-Moormann,
Seidel, Siess und Voss.

